

Aus dem Institut für Umwelthygiene und Praeventivmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. Dr. med. dent. W. Gräf

PIGMENTBILDUNG UND
MORPHOLOGISCHE KRITERIEN
BEI ANAEROBEN MYXOBAKTERIEN
(SPHAEROCYTOPHAGA)
VERGLEICHSWEISE ZU AEROBEN
MYXOBAKTERIEN

Inaugural -Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen -Nürnberg

vorgelegt von
Josef Schmitt
aus Windischeschenbach

1977

Aus dem Institut für Umwelthygiene und Praeventivmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. med. Dr. med. dent. W. Gräf

PIGMENTBILDUNG UND
MORPHOLOGISCHE KRITERIEN
BEI ANAEROBEN MYXOBAKTERIEN
(SPHAEROCYTOPHAGA)
VERGLEICHSGEWEISE ZU AEROBEN
MYXOBAKTERIEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Josef Schmitt
aus Windischeschenbach

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin

der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. W. Gräf

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 1977

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	Einleitung	1
II.	Technik und Untersuchungsmaterial	3
	1. Art und Herkunft der untersuchten Bakterienstämme	3
	2. Isolierungs- und Kultivierungstechnik der Stämme	4
	3. Untersuchung des Bewegungsverhaltens der ver- schiedensten Myxobakterien	6
	4. Rasterelektronenmikroskopische Präparation und Darstellung der Zellen	7
	5. Methodik der Pigmentgewinnung	8
III.	Untersuchungsergebnisse	11
	1. Kulturmorphologische Vergleiche	11
	2. Bewegungsverhalten der Vergleichskeime	14
	3. Rasterelektronenmikroskopische Vergleichsunter- suchungen der Zellen bzw. Zelloberflächen	15
	4. Vergleichende Pigmentuntersuchung bei den ver- schiedensten Teststämmen	21
IV.	Diskussion	25
V.	Zusammenfassung	27
VI.	Literatur	28



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Seit der ersten Beschreibung und Definierung der Gattung Sphaerocytophaga als einzige bisher bekannte anaerobe Myxobakterienart (Gräf, 1961; 1962; Gräf u. Morhard, 1966; Gräf u. Kuddella, 1962), haben diese Mundhöhlenanaerobier immer noch nicht ihren festen Platz in der bakteriologischen Taxonomie gefunden. Die Zuordnung dieser gleitend-beweglichen, mit aktiver Flexibilität ausgestatteten Mikroorganismen unter der Bezeichnung Fusocillus girans (Prévot, 1940) bzw. Fusobacterium girans (MacDonald, 1953) zur Gattung der Fusobakterien als eine bewegliche, geißellose Spezies (Werner, Schröter u. Wendling, 1967), liegt unseres Erachtens darin begründet, daß medizinischen Mikrobiologen die außerordentlich umfangreiche und eine extreme Sonderstellung unter den Bakterien einnehmende Ordnung Myxobacterales kaum praktisch geläufig ist. Andererseits sind die mit den Myxobakterien vertrauten Mikrobiologen zumeist als Naturwissenschaftler mit der Kultivierungstechnik von empfindlichen Anaerobiern wenig vertraut bzw. verfügen nicht über die technischen Voraussetzungen, solche empfindliche und anspruchsvolle, vom "Biotop Mensch" stammende Keimarten zu isolieren und fortzuzüchten.

Obwohl Gräf et al. in einer Reihe von Arbeiten die "Myxobacteriennatur" dieser Keime eindeutig belegt haben und auch Werner et al. bei eigenen elektronenoptischen Untersuchungen ihre viel näheren Beziehungen zu Myxobakterien als zu der eindeutig definierten Gattung Fusobacterium (Knorr) erkannt haben, wird aus Prioritätsgründen diese anaerobe Myxobakteriengattung zumeist noch als "Fusocillus girans" (Prévot, 1940) in der medizinisch-mikrobiologischen Terminologie geführt.

Die nachfolgenden Untersuchungen, vergleichsweise durchgeführt an anaeroben Myxobakterien (Sphaerocytophaga) und einigen typischen aeroben Myxobakterienstämmen der nicht fruktifizierenden Cytophaga- bzw. Sporocytophagagattung (Sporocytophaga cauliformis, Gräf u. Stürzenhofecker, 1964) und eines Vertreters der fruktifizierenden Gattung Myxococcus (Myxococcus fulvus) nebst eines Stammes von Vitreoscilla (Vitreoscilla proteolytica, Gräf u. Perschmann, 1970) mit gleichfalls gleitend-kriechendem Bewegungsverhalten, sollten gewisse morphologische und pigmentbezogene Gemeinsamkeiten ergeben. Die vergleichenden Pigmentuntersuchungen wurden insbesondere deshalb durchgeführt, weil gerade in der jüngeren Myxobakterienliteratur den Carotinoidpigmenten eine wesentliche Rolle bei der Beurteilung verschiedener Myxobakterienspezies eingeräumt wird (Reichenbach, 1965; Kleinig u. Reichenbach, 1969; 1970; Reichenbach u. Kleinig, 1971). Dabei war es unser Ziel, die Gemeinsamkeiten bzw. gewisse Übereinstimmungen der genannten Keimarten mit den anaeroben Sphaerocytophagastämmen herauszustellen und damit einen weiteren Beweis zu liefern, daß diese Mundhöhlenanaerobier nicht eine Fusobakterienspezies, sondern eine eindeutig abgrenzbare und exakt definierbare Gattung der Ordnung Myxobacterales darstellen.

II. TECHNIK UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL

1. Art und Herkunft der untersuchten Bakterienstämme

Bei den nachfolgend beschriebenen Vergleichsuntersuchungen wurden folgende Stämme verwendet:

- a) 4 Stämme von Sphaerocytophaga, darunter 3 Stämme der Spezies Sph. filiformis und 1 Stamm der Spezies Sph. fusiformis, die sämtlich aus der menschlichen Mundhöhle isoliert worden waren, teils aus Interdentalsekret gesunder Menschen, teils aus Zahnfleischtaschensekret parodontal erkrankter Patienten.
- b) 1 Stamm der Spezies Sporocytophaga (Sp. cauliformis), der, als Kulturstamm vorliegend, vor Jahren aus einer Trinkwasserversorgungsanlage in Ungarn isoliert worden war und dessen Kolonien eine gelbliche Färbung aufweisen.
- c) 1 Stamm der fruktifizierenden Myxobakterienspezies Myxococcus (M. fulvus), den wir aus dem Abwasser einer mechanisch-biologischen Kläranlage gezüchtet haben. Die Kulturen, insbesondere die Fruchtkörper, waren intensiv orangerot gefärbt.
- d) 1 Stamm von Vitreoscilla proteolytica, der Gattung Vitreoscilla angehörend, die nach Pringsheim (1963) fadenförmige, aus Einzelzellen bestehende, gleitend kriechende Mikroorganismen und in der gesamten Fadenlänge aktiv flexibel sind. Die Spezies Vitreoscilla proteolytica (Gräf u. Perschmann, 1970) bildet kulturmorphologisch deutlich sichtbar ein sehr eindrucksvolles, lachsrotes Pigment.

2. Isolierungs- und Kultivierungstechnik der Stämme

- a) Das jeweilige Sekretmaterial zur Isolierung von Sphaerocytophaga wurde mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und sogleich in Form des sog. fraktionierten Ösenausstrichs auf Blutagarplatten verimpft, sodann in klassischer Weise unter Verwendung eines Stammes von Serratia marcescens nach luftdichtem Verschließen gemäß dem Fortnerplattenprinzip bei 37 Grad bis zu 6 Tagen bebrütet. Nach dieser Zeit wurden die Platten kontrolliert und bei Vorliegen typischer, mit deutlichem Schwarmsaum umgebener Kolonien geöffnet und vom Schwarmsaum dieser Kolonien entnommenes Material weiter subkultiviert (Gräf, 1961). Nach ein- bis zweimaliger Wiederholung des Vorganges lagen sichere Reinkulturen vor, die dann im Anaerobiertopf (Gas-Pak Anaerobic Systems) bzw. als Stichkultur in Serumagarröhrchen fortgezüchtet bzw. aufbewahrt wurden.
- b) Der Stamm Sporocytophaga cauliformis, gemeinhin als Wassermyxobakterien bezeichnet, wurde grundsätzlich auf sog. Moutonagarplatten gezüchtet. Dabei handelt es sich um ein relativ nährstoffarmes Medium, entsprechend einer Fleischwasserbouillonverdünnung von 1 : 10. Der Stamm wurde zur Subkultivierung zumeist in Plattenmitte strichförmig überimpft, worauf bei einer Bebrütungstemperatur von 22 Grad innerhalb von 2 - 3 Tagen eine sich stetig vergrößernde, mit deutlichem Schwarmsaum umgebene, ovale, gelblich schillernde Kolonie entstand.
- c) Der Myxococcus fulvus - Stamm wurde in der von Gräf 1975 beschriebenen Weise durch Membranfiltration einer bestimmten Abwassermenge und Auflegen von Segmenten

dieser Filtermembran auf Kaninchenkotagar und Bebrütung bei 33 Grad isoliert.

(Zusammensetzung des Kaninchenkotagars nach Gräf : 20 g getrocknete Kaninchenkugeln werden mit 1 Liter Aqua dest. für 20 min gekocht, anschließend durch Faltenfilter filtriert und das Filtrat wieder auf 1 Liter Volumen mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach Zusatz von 2 % Agar (Difco Bacto-Agar) wird im Autoklav sterilisiert und auf pH 7,2 eingestellt.)

Von den nach 4 - 5 Tagen auf der Filteroberseite entstandenen, pilzartigen Fruchtkörpern wurden vorsichtig einzelne Exemplare entnommen und auf die Mitte einer neuen Kaninchenkotagarplatte gesetzt, und diese wiederum bei 33 Grad bebrütet. Die Myxobakterien schwärmen von der Impfstelle unter Bildung hexenringartiger, konzentrischer Fruchtkörperringe aus und reinigen sich damit praktisch eigenständig von Begleitkeimen. Nach zwei- bis dreimaliger Subkultivierung vom jeweiligen Schwarmsaum aus in der geschilderten Weise waren leicht die gewünschten Reinkulturen zu erhalten.

- d) Vitreoscilla proteolytica wurde grundsätzlich in gleicher Weise reinkultiviert wie M. fulvus, d.h. es wurden wiederum entsprechende Abwasserfiltersegmente auf Kaninchenkotagar aufgelegt, bei 33 Grad bebrütet, und bei Entstehen der typischen netz- bzw. lochmusterartigen Schwarmzonen von diesen Subkulturen angelegt (Gräf u. Perschmann, 1970). Auch hier war durch zwei- bis dreimaliges Subkultivieren von Schwarmrandmaterial auf die Mitte frischer Nähragar-

platten eine Reinkultur mit ihrer charakteristischen netz- und lochmusterartigen Kulturmorphologie zu erzielen.

3. Untersuchung des Bewegungsverhaltens der verschiedenen Myxobakterien

Ein wesentliches, gemeinsames Kriterium aller Myxobakterien besteht in ihrem gleitend kriechenden Bewegungsverhalten, das nach allgemeiner Ansicht und einer Reihe von experimentellen Untersuchungen (Gräf, 1961; 1965) nicht auf der bei sonstigen beweglichen Bakterien üblichen Begeißelung beruht, sondern durch einen speziellen Bewegungsmechanismus bewirkt wird. Die sicherste Möglichkeit, die gleitend kriechenden Bewegungen bzw. die oft auftretenden, aktiven Flexibilitätserscheinungen zu verifizieren, besteht in der phasenkontrastmikroskopischen Beobachtung von mit Vaselineabdichtung versehenen Klatschpräparaten. Dabei wird zweckmäßigerweise die Mikroskopierebene auf die obere oder untere Glasoberfläche eingestellt und dort liegende Zellen werden entsprechende Zeit beobachtet. Bei den anaeroben Myxobakterien, deren Kultivierungsoptimum bei 37 Grad liegt, ist zusätzlich darauf zu achten, daß die Präparate nicht zu stark abkühlen, da die Bewegungsvorgänge dann erheblich gemindert werden.

4. Rasterelektronenoptische Präparation und Darstellung der Zellen

Bei der Herstellung der Präparate für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung mußte generell beachtet werden, daß es sich bei den vorliegenden Mikroorganismen um Keime handelt, die im Gegensatz zu den Eubakterien keine starre, formgebende Zellmembran aufweisen, sondern dünne, flexible Zellwände besitzen und deshalb besonders empfindlich gegen äußere chemische und physikalische Einwirkungen sind, wie sie bei der Präparation auftreten können. Um ferner kulturmorphologische Vergleiche anstellen zu können, durften die Keime nicht von ihren Nährmedien entfernt werden, d. h. der Nähragar mußte mit in das Präparat einbezogen werden. Unter diesen Gesichtspunkten war eine möglichst schonende Präparationstechnik angezeigt.

Sämtliche Bakterienstämme wurden gleichermaßen wie folgt behandelt:

Zunächst wurden aus den jeweiligen bewachsenen Nährmedien etwa pfenniggroße Scheibchen so herausgeschnitten, daß neben der Kultur auch der peripher liegende Schwarmsaum mit erfaßt wurde. Zur Fixierung wurden diese Agarscheibchen 24 Stunden lang in Glutaraldehyd eingelegt (2,5 %iger Glutaraldehyd in 0,1 m Phosphatpuffer, pH 7,4). Die darauf folgende Dehydrierung wurde in einer aufsteigenden Acetonreihe von 20 - 100 % vorgenommen. Die Präparate verblieben in jeder Konzentrationsstufe 30 min und weitere 12 Stunden in reinem Aceton. Wie in einem Vorversuch festgestellt wurde, durften auf Grund des hohen Wassergehalts im Nähragar diese Zeiten nicht unterschritten werden, da es sonst durch die bei der nachfolgenden Trocknung auftretenden Oberflächenspannungen zur Deformierung des Präparates

kommt. Die Trocknung wurde nach der Critical-Point -Trocknungsmethode mit CO_2 durchgeführt, wobei Aceton schrittweise durch CO_2 substituiert wird. Die so vorbereiteten Präparate wurden nach dem Sputter-Verfahren ca. 4 min mit Gold bedampft (Sputter coater, Fa. Polaron), wobei sich ein Vorbedampfen mit Kohle erübrigt. Die bedampften Präparate wurden sodann mit Leitsilber auf den Objektträgern der verwendeten Rasterelektronenmikroskope (Jeol JSM-S 1, 10 kV und AKASHI MSM, 15 kV) fixiert und standen damit für die rasterelektronenoptische Untersuchung zur Verfügung.

5. Methodik der Pigmentgewinnung

Zur Pigmentgewinnung war es in jedem Falle notwendig, Massenkulturen der jeweiligen Myxobakterienstämme anzuzüchten, die zugleich möglichst völlig frei von Nährbodenbestandteilen sein sollten. Unter diesen Gesichtspunkten bot sich als optimal die Verwendung von festen Nährmedien an, da hier die entsprechenden Kulturrasen abgeräumt werden konnten, ohne daß Pigmente oder sonstige Bestandteile des Nährmediums mit erfaßt worden wären.

Für die jeweiligen verschiedenen Myxobakterienstämme mußten naturgemäß unterschiedliche Nährmedien zur Pigmentgewinnung herangezogen werden.

- a) Sphaerocytophaga: Da diese anspruchsvollen Anaerobier grundsätzlich neben anaeroben Wachstumsbedingungen auch hohe Nährbodenansprüche stellen (Blutagarmedien), wir aber Blutagarmedien nicht verwenden wollten, um nicht doch etwaige Blutpigmentderivate in die Kulturen zu bekommen,

haben wir Serumagarplatten benutzt, d.h. den käuflichen Tryptose-Agar (Tryptone Soya Agar; Oxoid, CM 131) versetzt mit 10 % sterilem, konservierungsmittelfreiem Normalserum vom Rind (Boviserin; Behring-Werke, ORKP 44). Die flächenhaft mit einer NaCl-Suspension der Keime inokulierten Nährmedien wurden im Anaerobiertopf (Gas Pak, Anaerobic Systems) für etwa 8 Tage bei 37 Grad bebrütet. Dann wurden die jeweiligen Bakterienrasen mit Glasspateln abgeräumt und in das betreffende Lösungsmittel gegeben.

- b) Sporocytophaga cauliformis: In diesem Falle wurde zur Massenkultivierung der ohnedies nährstoff- und pigmentarme Moutonagar benutzt (siehe Abschn. II, 2.b). Nach flächenhaftem Bewuchs der Platten, was bei Temperaturen von 22 Grad in etwa 4 - 5 Tagen durch das Schwärmvermögen der Keime erfolgt war, wurden auch hier die Bakterienrasen entsprechend abgeräumt und in das Extraktionsmittel gebracht.
- c) Myxococcus fulvus und Vitreoscilla proteolytica: Zur Massenkultivierung dieser beiden Keimarten haben wir den oben beschriebenen Kaninchenkotagar verwendet, wobei auch hier die Keime entsprechend ihres Schwärmverhaltens bei Bebrütungstemperatur von 33 Grad innerhalb von 10-14 Tagen die gesamte Plattenoberfläche in Form eines Kulturrasens bewachsen hatten. Die weitere Behandlung erfolgte analog den anderen Teststämmen.

Das gewonnene Bakterienmaterial der einzelnen Teststämme wurde in Reagenzgläsern mit je 3 ml Äthanol als Extraktionsmittel suspendiert und 24 Stunden extrahiert, um so eine völlige

Lösung der vorhandenen Pigmente zu erreichen. Danach wurden die Röhrchen 15 min lang bei 3000 U/min zentrifugiert und der Extrakt vorsichtig abgehebert. Die Spektralabsorptionskurven der jeweiligen Pigmentextrakte wurden mit einem fortlaufend registrierenden Spektralphotometer (DK 2, Fa. Beckman) im Bereich von 320-700 nm aufgezeichnet.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

1. Kulturmorphologische Vergleiche

Eine typische kulturmorphologische Eigenschaft gleitend-kriechender Bakterien besteht darin, daß Oberflächenkulturen solcher Keime, d.h. somit alle Myxobakterienkolonien von einem mehr oder weniger deutlichen Schwarmsaum umgeben sind. Mit zunehmendem Wachstum der Kolonie verschiebt sich der Schwarmsaum stetig konzentrisch nach außen, bis die gesamte Nähragaroberfläche bewachsen ist. Bei fruktifizierenden Myxobakterien entwickeln sich zusätzlich in hexenringartiger Anordnung konzentrische Kreise von sog. Fruchtkörpern. Im Folgenden wird eine Reihe von typischen, mit Schwarmsaum umgebenen Oberflächenkolonien der jeweiligen Vergleichsstämme dargestellt und auf diese Weise die überzeugende kulturmorphologische Übereinstimmung der zum Vergleich herangezogenen klassischen Myxobakterien mit den anaeroben Myxobakterien der Gattung Sphaerocytophaga bzw. dem ebenfalls gleitend beweglichen Stamm von Vitreoscilla proteolytica belegt.

Zusammenfassend läßt sich aus den vergleichsweise dargestellten Oberflächenkolonien der einzelnen Teststämme eine unverkennbare Übereinstimmung und Ähnlichkeit konstatieren, die bei Vorliegen einiger bakteriologischer Erfahrung jedem Betrachter zumindest als ein wesentliches Indiz für die systematische Gemeinsamkeit dieser Keime erscheinen muß. Die im Folgenden noch dargelegten Befunde werden dies bestätigen.

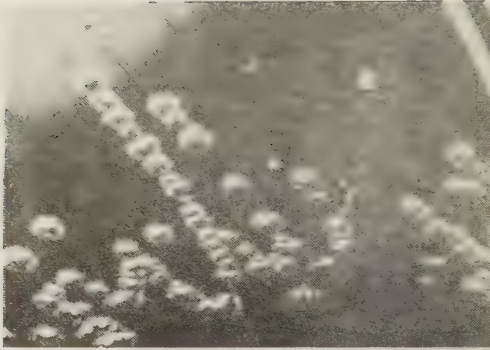


Abb. 1

Die Aufnahme zeigt die typischen Oberflächenkolonien von Sphaerocytophaga spec. auf einer anaerob bebrüteten Blutagarplatte. Besonders zu beachten ist der hauchartige Schwarmsaum, der die leicht gelblich irisierenden, glasigen Einzelkolonien umgibt.

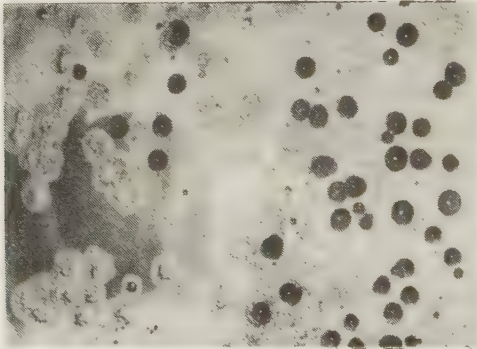


Abb. 2

Typische Einzelkolonien von Sporocytophaga cauliformis ("Wassermyxobakterien"), die bei einer Bebrütungstemperatur von 22 Grad auf Moutonagar durch flächenhafte Beimpfung einer Oberflächenwasserprobe zum Wachstum gebracht worden waren. Die Ähnlichkeit der Kolonien, d.h. wiederum glasige, gelblich irisierende Oberflächenkolonien mit hauchartigem Schwarmsaum, zu den in Abb. 1 dargestellten anaeroben Myxobakterien ist unverkennbar. Die runden, dunkel erscheinenden Kolonien sind Keime der Spezies Pseudomonas fluorescens.

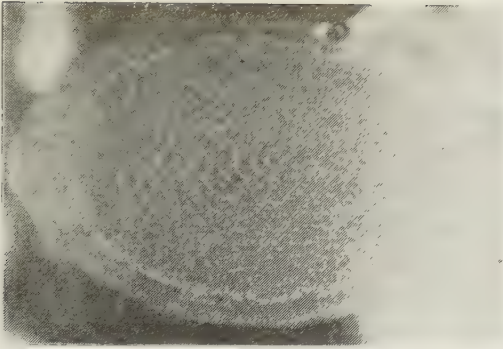


Abb. 3

Das Bild zeigt eine Oberflächenkolonie von Myxococcus fulvus (fruktifizierende Myxobakterien), die sich von der Impfstelle aus konzentrisch unter Entwicklung hexenringartiger Fruchtkörperzonen auf Kaninchenkotagar bei 33 Grad Bebrütungstemperatur innerhalb von 10 Tagen entwickelt hat. Auch hier ist an der Peripherie der Kolonie der für alle Myxobakterien kennzeichnende Schwarmsaum deutlich sichtbar.

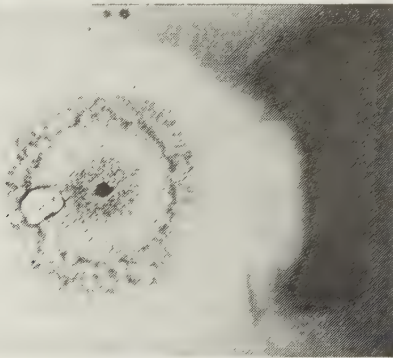


Abb. 4

Oberflächenkultur eines Stammes von Vitreoscilla proteolytica auf Kaninchenkotagar bei 33 Grad kultiviert. Wiederum ist bei der konzentrisch von der Impfstelle sich ausbreitenden Oberflächenkultur neben den charakteristischen Einrißlöchern im Koloniezentrum an der Peripherie ein deutlicher Schwarmsaum erkennbar, welcher auch bei dieser Bakteriengattung die gleitend-kriechende Bewegungsform dokumentiert.

2. Bewegungsverhalten der Vergleichskeime

Bei der oben beschriebenen Beobachtungstechnik von Nativpräparaten mittels Phasenkontrastmikroskop ergeben sich insbesondere bei den ersten drei genannten Keimarten (Sphaerocytophaga spec., Sporocytophaga cauliformis, Myxococcus fulvus) derartig übereinstimmende Bewegungsabläufe, daß ein Zweifel an der gemeinsamen Myxobakteriennatur dieser Keime praktisch nicht mehr existiert:

Die flexiblen Stäbchen sind in der freien Flüssigkeitsschicht grundsätzlich bewegungslos. Sobald sie Kontakt mit der oberen oder unteren Glasoberfläche erhalten, heften sie sich fest und vollführen äußerst charakteristische Bewegungsformen. Sie gleiten stetig vorwärts, oft unterbrochen von Richtungsänderungen, die durch peitschenartige Schlagbewegungen hervorgerufen werden. Zuweilen wird die Gleitbewegung auch kurzzeitig "rückwärts" durchgeführt, im wesentlichen scheint aber eine Vorzugsbewegungsrichtung der Stäbchen vorhanden zu sein. Weiterhin typisch sind zuweilen auftretende Rotationsbewegungen der Stäbchen um ein fixiertes Ende, die man am ehesten als uhrzeigerartig charakterisieren kann. Als letzte Gemeinsamkeit der Bewegungsformen soll die stets vorhandene, aktive Flexibilität der Keime herausgestellt werden, die sich oft in schlangenartigen Verbiegungen und Verdrehungen der Stäbchen manifestiert und beweist, daß diese Keime eine starre Zellwand nicht besitzen. Weitere Einzelheiten des Bewegungsverhaltens hat Gräf 1961 bei den anaeroben Myxobakterien der Gattung Sphaerocytophaga beschrieben. Bei Vitreoscilla proteolytica sind die Bewegungsformen, bedingt durch die fadenförmige Gestalt der Keime etwas different, wenngleich prinzipiell doch übereinstimmend.

Auch hier dominiert die stetige, gleitende Bewegung der Zellen, die stets begleitet ist von mehr oder weniger deutlichen, aktiven Zuckungs- und Verbiegungserscheinungen. Die freien Enden der Zellfäden lassen ebenfalls sehr oft die bei den Myxobakterienzellen typischen peitschenartigen Schlagbewegungen erkennen.

3. Rasterelektronenmikroskopische Vergleichsuntersuchungen der Zellen bzw. Zelloberflächen

In früheren Arbeiten hat bereits Gräf (1961; 1965) mit Hilfe einer umfangreichen Reihe elektronenoptischer Aufnahmen den Bewegungsapparat der anaeroben Myxobakterien untersucht und ist dabei zu dem Schluß gekommen, daß die gleitend-kriechende Bewegungsweise dieser Keime durch Schleimauflagerungen bewirkt wird, welche die Zelloberflächen raupenkettenartig umlaufen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Zellwand der Keime aus längs- und querverlaufenden Fibrillenbündeln besteht, durch deren aktive Kontraktibilität die Flexibilität der Keime bzw. ihre aktiven Abknick- und Zuckungsbewegungen verursacht werden.

Der durch die Entwicklung der Rasterelektronenmikroskopie erreichte Fortschritt in der Oberflächendarstellung kleinster Objekte veranlaßte uns, die Oberflächenstruktur der anaeroben Myxobakterien (Sphaerocytophaga) im Vergleich mit den anderen Myxobakterienstämmen bzw. mit dem Vitreoscilla-stamm zu untersuchen und durch etwa vorhandene Gemeinsamkeiten die Zusammengehörigkeit der Keime zu dokumentieren.

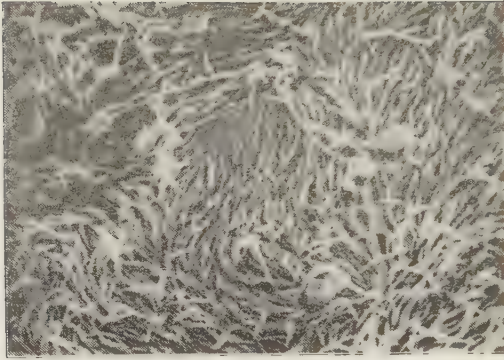


Abb. 5

Rasterelektronenoptische Übersichtsaufnahme aus dem Schwarm-
saum einer Kolonie von Sphaerocytophaga. Vergr. 1:2000 .

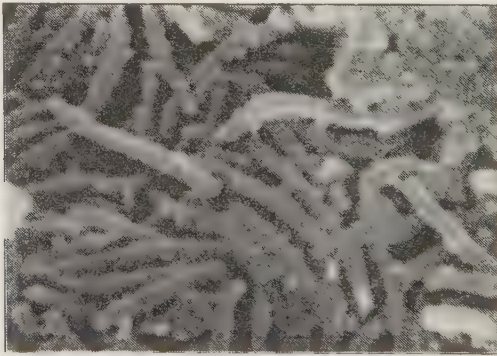


Abb. 6

Stärkere Vergrößerung eines Präparates von Sphaerocytophaga.
Trotz der relativen Unschärfe ist die Flexibilität der Zellen
und insbesondere das Vorliegen von strukturlosen Auflagerun-
gen auf der Zelloberfläche deutlich erkennbar. Diese höckeri-
gen Oberflächenauflagerungen sind als geschrumpfte Schleim-
klümpchen zu deuten, die in vivo den raupenartigen Bewegungs-
apparat darstellen. Vergr. 1:15000.

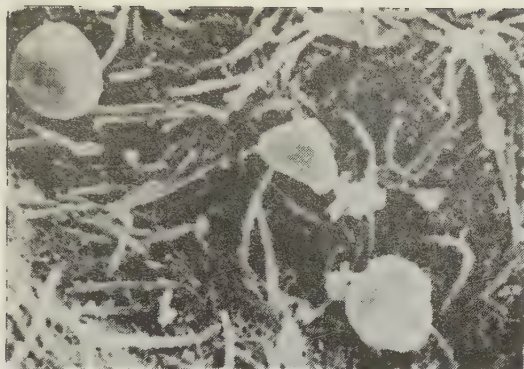


Abb. 7

Weitere rasterelektronenoptische Darstellung von anaeroben Myxobakterien. Hier ist die regelmäßige oberflächliche Höckerung bei nahezu allen Zellen zu erkennen. Die Deutung dieser Strukturen im Sinne des Schleimüberzugs, der die Gleitbewegung bedingt, ist naheliegend. Vergr. 1 : 5000.

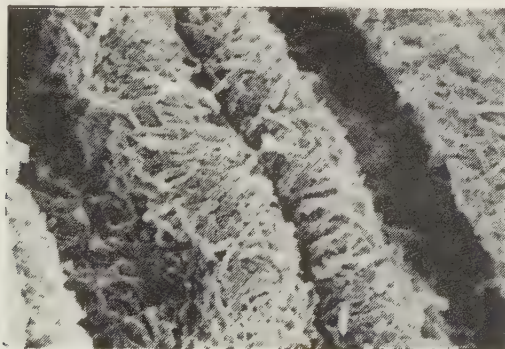


Abb. 8

Rasterelektronenoptische Übersichtsaufnahme des Schwarmsaums einer Wassermyxobakterienkolonie (Sporocytophaga cauliformis). Vergr. 1 : 3000.

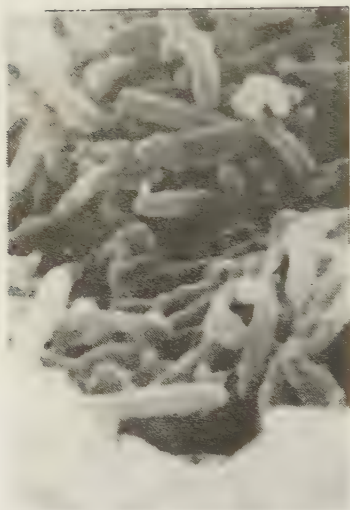


Abb. 9

Vergrößerter Ausschnitt des Präparates aus Abb. 8. In Übereinstimmung mit Sphaerocytophaga finden sich auch hier die gleichen höckrigen Auflagerungen auf den Zelloberflächen. Diese weisen wiederum auf das Vorliegen eines Schleimüberzugs der Zellen hin.
Vergr. 1 : 20 000

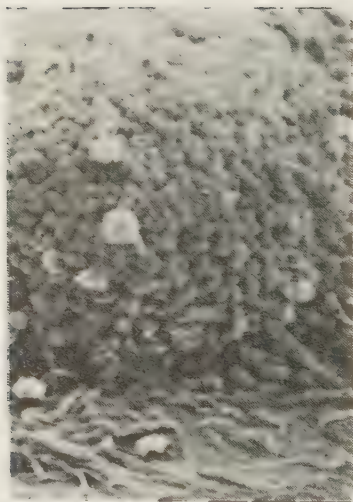


Abb. 10

Rasterelektronenoptische Aufnahme eines Fruchtkörpers von Myxococcus fulvus. Deutlich sind die den pilzartigen Fruchtkörper formenden, runden Mikrocyten erkennbar. Am Fuße des Fruchtkörpers ist eindrucksvoll das weitere Hinzuwandern noch vegetativer Myxobakterienzellen, sowie eine beginnende Umwandlung zur Mikrocyte wahrzunehmen.
Vergr. 1 : 3000

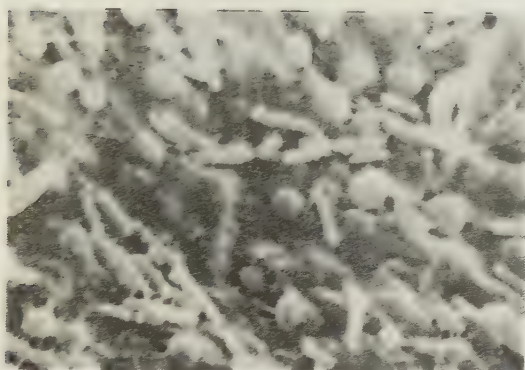


Abb. 11

Stärkere Vergrößerung eines Präparates von Myxococcus fulvus. Neben den runden Mikrocysten sind noch zahlreiche vegetative Zellen von Myxococcus fulvus erkennbar, die teils wiederum die höckerigen Schleimauflagerungen erkennen lassen. Andererseits imponieren die Schleimauflagerungen gegenüber benachbarten Zellen als klebrige Fäden. Vergr. 1 : 5000.

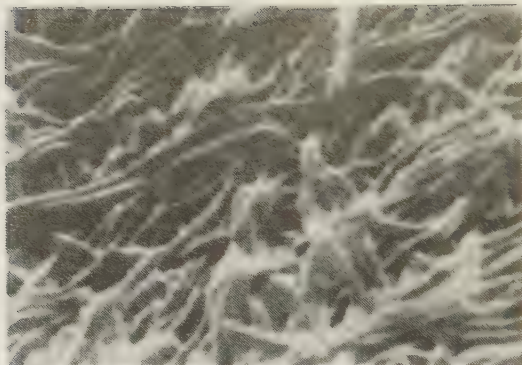


Abb. 12

Rasterelektronenoptische Darstellung einer Oberflächenkultur von Vitreoscilla proteolytica. Auffallend ist, daß diese gleitend-kriechenden, aktiv flexiblen Mikroorganismen, die eindeutig aus mehrzelligen Fäden bestehen, auf der Oberfläche eine Segmentierung in einzelne Zellelemente nicht erkennen lassen. Das ist ein Beweis, daß auch hier, übereinstimmend mit den übrigen Mikroorganismen, eine Schleimschicht die gesamte Fadenoberfläche umgibt, und genauso wie bei den Myxobakterien die Gleitbewegung durch die Funktion dieser Schleimschicht bewirkt wird. Vergr. 1:5000.

Die aus einer größeren Anzahl von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgewählten, vorstehenden Abbildungen geben exemplarisch die gefundenen Ergebnisse wieder.

Die rasterelektronenoptischen Darstellungen führen wiederum zu der Erkenntnis, daß die Gleitbewegungen bei Myxobakterien nicht durch geformte Bewegungsorganellen zustande kommen, sondern ganz offensichtlich eine amorphe, strukturlose Schleimschicht auf der Zelloberfläche, die auf noch unklare Weise in Bewegung

gehalten wird, für die spezifische Bewegungsart dieser Mikroorganismen verantwortlich ist. Außerdem beweisen die raster-elektronenoptischen Befunde die absolute Übereinstimmung des Zellaufbaus bei den anaeroben Myxobakterien mit den anderen vergleichsweise dargestellten Myxobakterienstämmen. Es kann somit kein Zweifel mehr an der Myxobakteriennatur dieser Mundhöhlenanaerobier bestehen; die unzutreffende Zuordnung dieser Keime zu der Gattung Fusobacterium (Fusocillus girans) sollte endlich aufgegeben werden.

4. Vergleichende Pigmentuntersuchung bei den verschiedenen Teststämmen

Eine weitere auffallende Eigenschaft der Myxobakterien besteht neben der Beweglichkeit in ihrer Fähigkeit, eindrucksvoll gefärbte Pigmente zu bilden. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß für die farbige Vielfalt vieler Myxobakterienkolonien in erster Linie Carotinoide verantwortlich sind. Vor allem in jüngerer Zeit haben Kleinig und Reichenbach viele dieser Myxobakterienpigmente in Reinform dargestellt und unter chemosystematischen Gesichtspunkten untersucht mit dem Ziel, Unterschiede im Carotinoidmuster der verschiedenen Myxobakterien untereinander bzw. zu ihnen nahestehenden Keimen, wie z. B. Flexibacter spez., festzustellen.

So lag es für uns nahe, auch die vorliegenden anaeroben Myxobakterien (Sphaerocytophaga) auf ihre Fähigkeit zur Pigmentbildung hin zu untersuchen und spektralphotometrisch Pigmentvergleiche mit anderen typischen Myxobakterien sowie einem ebenfalls pigmentbildenden, gleitend beweglichen Vitreoscilla

stamm vorzunehmen, um auch hinsichtlich dieser typischen Myxobakterieneigenschaft eventuelle Gemeinsamkeiten feststellen zu können.

Grundsätzlich konnten bei allen verwendeten Bakterienstämmen nach der oben beschriebenen Methode Farbstoffe extrahiert und bei der spektralphotometrischen Untersuchung charakteristische Absorptionskurven registriert werden (Abb. 13).

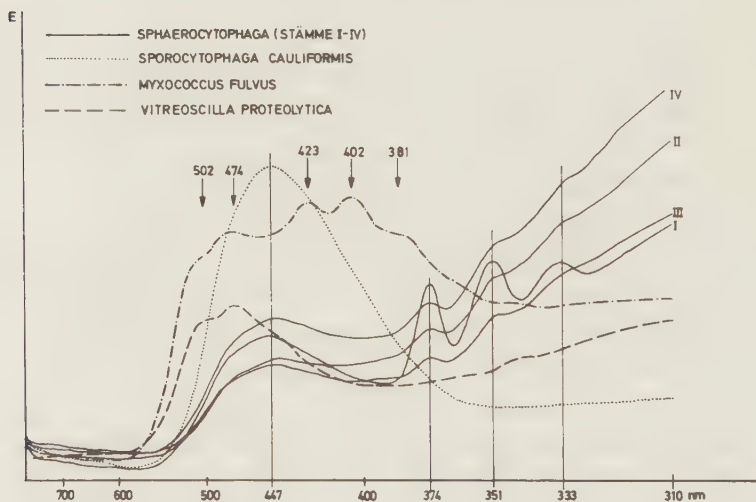


Abb. 13

Die Abbildung zeigt die registrierten Extinktionskurven für die in Äthanol extrahierten Pigmente der vergleichsweise untersuchten Myxobakterienstämme und eines Stammes von Vitreoscilla proteolytica.

- a) Von allen 4 Sphaerocytophagastämmen konnte jeweils ein gelblich-grünlicher Extrakt gewonnen werden, wobei bei etwa gleicher suspendierter Bakterienmenge leichte Intensitätsunterschiede bei den verschiedenen Stämmen feststellbar waren. Die registrierten Absorptionsmaxima lagen bei 333, 351, 374 und 447 nm und waren bei Stamm I besonders stark ausgeprägt, wogegen bei den restlichen 3 Stämmen z.T. nur schulterförmige Maxima registriert wurden.
- b) Das von Sporocytophaga cauliformis gebildete, intensiv orangefarbene Pigment ergab einen ebenfalls gelb gefärbten Extrakt, dessen einziges Maximum übereinstimmend mit Sphaerocytophaga bei 447 nm gefunden wurde.
- c) Die beim Zusammenstreichen intensiv orangerot gefärbten Bakterienmassen von Myxococcus fulvus lieferten einen rötlichen Extrakt, der bei 402, 423 und 474 nm deutliche Maxima aufwies und schulterförmige Maxima bei 381 und 502 nm.
- d) Für das von Vitreoscilla proteolytica gebildete lachsrote Pigment konnte übereinstimmend mit Myxococcus fulvus bei 474 nm ein Maximum und bei 502 nm eine Schulter festgestellt werden.

Ein Vergleich der für die einzelnen Stämme festgestellten Absorptionsmaxima mit den Extinktionskurven reiner Myxobakterienpigmente, insbesondere Carotinoide, wie sie von Reichenbach und Kleinig in Reinform dargestellt und gemessen wurden, rechtfertigen die Annahme, daß es sich auch bei den unseren um Carotinoide handelt. Besonders hingewiesen sei auf die Übereinstimmung der Absorptionskurven von Sphaerocytophaga und Sporocytophaga cauliformis in ihrem Maximum bei 447 nm, so-

wie auf die Tatsache, daß die bei 333, 351 und 374 nm für Sphaerocytophaga registrierten Maxima starke Übereinstimmung zeigen mit den von Kleinig u. Reichenbach angegebenen Maxima für Phytofluen, das als gelblich-grünliche Fraktion bei Myxococcus fulvus eluiert wurde und schon früher als erstes Pigment bei Myxobakterien gefunden worden war. Speziell Sphaerocytophaga betreffend, sehen wir darin einen weiteren Beweis für die Myxobakteriennatur dieser Keime und deren gerechtfertigte Zuordnung zu den Myxobakterien.

Einschränkend muß zu diesen Kurven bemerkt werden, daß es sich hier jeweils um Summenkurven sicher mehrerer einzelner Farbkomponenten handelt. Es war nicht Ziel und Zweck dieser Untersuchungen, ins einzelne gehende Pigmentanalysen bei unseren Myxobakterienstämmen durchzuführen, da es uns vielmehr darauf ankam, durch vergleichende Untersuchungen des Pigments von Sphaerocytophaga mit dem anderer typischer Myxobakterienstämmen vorhandene Gemeinsamkeiten herauszustellen.

IV. DISKUSSION

Seit der im wesentlichen heute noch gültigen Begründung der Gattung Fusobacterium durch M. Knorr (1923) sind in mehrfacher Weise die ursprünglichen Speziesvertreter dieser Gattung, nämlich F. nucleatum, F. polymorphum und F. Plauti-Vincenti, umgruppiert und z.T. in andere Bakteriengattungen eingegliedert worden. Ausführliche Darstellungen dieser Sachlage finden sich bei Gräf (1961), Berger u. Hummel (1964) sowie bei Werner (1967)

Sehr unübersichtlich und unlogisch wurde die taxonomische Situation dieser Anaerobier, als der bisher eindeutig als unbeweglich definierten Gattung Fusobacterium von Prévot (1940) eine weitere Spezies zugefügt wurde, die spezifische, uhrzeigerartige und z.T. gleitende Bewegungsformen aufwies und im übrigen keinerlei Begeißelung erkennen ließ. Umfangreiche Untersuchungen von Gräf (1961) führten schließlich zu der unwiderlegbaren Feststellung, daß diese Keime (Fusocillus girans Prévot bzw. Fusobacterium girans MacDonald) grundsätzlich auf Grund ihres geißellosen Bewegungsverhaltens und ihres von den Eubakterien abweichenden Zellaufbaus zur Ordnung der Myxobacterales gezählt werden müssen und damit die einzigen, bisher beim Menschen gefundenen, im übrigen strikt anaeroben Myxobakterien darstellen. Trotz der Postulierung einer eigenen Gattung Sphaerocytophaga für diese anaeroben Myxobakterien und ihrer mehrfachen Beschreibung und Anerkennung als solche (Werner, 1968; Berger u. Hummel, 1964; Hallmann u. Burkhardt, 1974) bestehen aber offenbar immer noch Bedenken, diese Mundhöhlenanaerobier aus der Gattung der Fusobakterien

herauszunehmen und zu den Myxobakterien zu zählen.

Unsere auf physiologischer, chemischer und rasterelektronen-optischer Basis beruhenden Vergleichsuntersuchungen von Vertretern der Gattung Sphaerocytophaga mit typischen anderen Myxobakterienstämmen haben ausgeprägte kulturmorphologische, bewegungsphysiologische, zytologische und pigmentchemische Übereinstimmungen erbracht, daß kaum weitere Zweifel an der Myxobakteriennatur dieser Mundhöhlenanaerobier bestehen können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Vergleichsuntersuchungen von anaeroben Myxobakterien der Gattung Sphaerocytophaga mit zwei typischen Vertretern der Ordnung Myxobacterales (Myxococcus fulvus und Sporocytophaga cauliformis) sowie einem Stamm von Vitreoscilla (Vitreoscilla proteolytica) durchgeföhrt.

Folgende Gemeinsamkeiten konnten festgestellt werden: Kultur-morphologisch imponieren bei Sphaerocytophaga analog zu den anderen untersuchten Stämmen schwarmsaumumgebene Kolonien. Insbesondere fällt die große Ähnlichkeit der Kolonieformen mit Sporocytophaga cauliformis auf.

Das für Sphaerocytophaga typische gleitend-kriechende Bewegungsverhalten konnte bei allen untersuchten Stämmen gleichermaßen festgestellt werden.

Bei der rasterelektronenoptischen Untersuchung konnten neben zytologischen Gemeinsamkeiten amorphe Schleimauflagerungen auf den Zelloberflächen aller Vergleichskeime festgestellt werden, die das Vorliegen geformter Bewegungsorganellen ausschließen.

Sphaerocytophaga bildet wie die übrigen untersuchten Keime Pigmente, deren Extinktionsmaxima das Vorliegen von Carotinoiden vermuten lassen.

VI. LITERATUR

- Berger, U. u.
K. Hummel: Einführung in die Mikrobiologie und Immunologie unter besonderer Berücksichtigung der Mundhöhle.
Urban & Schwarzenberg, München - Berlin 1964
- Gräf, W.: Anaerobe Myxobakterien, neue Mikroben in der menschlichen Mundhöhle.
Arch. Hyg. 145, 405-459 (1961)
- Gräf, W.: Die cytopathogenen Eigenschaften der anaeroben Myxobakterien.
Arch. Hyg. 146, 481-491 (1962)
- Gräf, W.: Die Pathogenität anaerober Myxobakterien (Sphaerocytophaga) im Tierversuch.
Arch. Hyg. 146, 492-500 (1962)
- Gräf, W.: Über Wassermyxobakterien.
Arch. Hyg. 146, 114-125 (1962)
- Gräf, W.: Myxobakterien der Gattung Myxococcus als indirekte Fäkalstoffindikatoren in Oberflächengewässern.
1. Mitteilung. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 160, 28-39 (1975)
- Gräf, W.: Bewegungsorganellen bei Myxobakterien.
Arch. Hyg. 149, 519-526 (1965)
- Gräf, W. u.
F. Kudella: Vorkommen und pathogenetische Bedeutung anaerober Myxobakterien bei entzündlichen marginalen Parodontopathien.
DDZ 10, 299-302 (1966)

- Gräf, W. u.
H. Morhard: Antibiotikaempfindlichkeit von anaeroben Myxobakterien.
Arch. Hyg. 150, 135-139 (1966)
- Gräf, W. u.
G. Perschmann: Über eine neue Spezies von *Vitreoscilla* (*Vitr. proteolytica*) im Bodensee.
Arch. Hyg. 154, 128-137 (1970)
- Gräf, W. u. P.
Stürzenhofecker: Biologie und Vorkommen von aeroben Wassermyxobakterien (*Sporocytophaga cauliformis*) im Bodensee.
Arch. Hyg. 148, 79-96 (1964)
- Hallmann, L. u.
F. Burkhardt: Klinische Mikrobiologie.
Stuttgart 1974
- Kleinig, H. u.
H. Reichenbach: Carotenoid Pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). I. The Minor Carotenoids.
Arch. Mikrobiol. 68, 210-217 (1969)
- Kleinig, H. u.
H. Reichenbach: Carotenoid Pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). II. Acylated Carotenoid Glucosides.
Arch. Mikrobiol. 74, 223-234 (1970)
- Knorr, M.: Über die fusospirilläre Symbiose, die Gattung *Fusobacterium* (K. B. Lehmann) und *Spirillum spontigenum* (zugleich ein Beitrag zur Bakteriologie der Mundhöhle).
I. Mitteilung: Die Epidemiologie der fusospirillären Symbiose, besonders der Plaut-Vincent'schen Angina.
Zbl. Bakt., I. Orig. 87, 536-545 (1922)

II. Mitteilung: Die Gattung Fusobacterium.

Zbl. Bakt., I. Orgi. 89, 4-22 (1923)

MacDonald, J. B. : The Motile Non-Sporulating Anaerobic
Rods of the Oral Cavity.
Monograph, University of Toronto Press
(1953)

Prévot, A.-R. : Recherches sur la flore anaérobie de
l'intestine humaine: *Fusocillus girans*
nov. sp.
C.R. Soc. Biol. 133, 384 (1940)

Pringsheim, E. G. : Farblose Algen.
G. Fischer, Stuttgart 1963

Reichenbach, H. : Untersuchungen an *Archangium violaceum*.
Ein Beitrag zur Kenntnis der Myxobak-
terien.
Arch. Mikrobiol. 52, 376-403 (1965)

Reichenbach, H. u.
H. Kleinig: The Carotenoids of *Myxococcus fulvus*
(Myxobacterales).
Arch. Mikrobiol. 76, 364-380 (1971)

Reichenbach, H. u.
H. Kleinig: Die Carotinoide der Myxobakterien.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 220,
458-463 (1972)

Werner, H. : Die gramnegativen, anaeroben, sporen-
losen Stäbchen des Menschen.
Jena 1968

Werner, H. ,
Schröter, G. u. Lungenabszeß und Pleuraempyem durch
Fusocillus girans PREVOT 1940.

N. Wendling: Zbl. Bakt., I. Abt. 204, 232-238 (1967)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. Dr. W. Gräf für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung zu danken.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. M. Hofmann für die Arbeitsmöglichkeit im rasterelektronenmikroskopischen Labor der Klinik und Poliklinik für Zahn- Mund- und Kieferkrankheiten, sowie Herrn Dipl.-Phys. P. Pröschel für die Unterstützung bei der Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Am 22. Juni 1949 wurde ich, Josef Julius Schmitt, als Sohn des Polizeimeisters Josef Schmitt und seiner Ehefrau Agathe Schmitt, geb. Kellermann, in Windischeschenbach, Land Bayern, geboren. Nach Besuch der Volksschule in Windischeschenbach trat ich nach der 6. Klasse in das Augustinus-Gymnasium in Weiden/Opf. über, wo ich am 19. Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte. Im WS 71/72 begann ich das Studium der Zahnheilkunde an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen und legte hier im August 1972 das Vorphysikum und im März 1974 das Physikum ab.

Mein Studium beendete ich mit der zahnärztlichen Prüfung am 13. Dezember 1976.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197